

กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส*

Pretreatment processes for enhancing the efficiency of ethanol production from lignocellulosic agricultural wastes

รัชพล พะวงศ์รัตน์ (Ratchapol Pawongrat)**

บทคัดย่อ

การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักเป็นอีกหนึ่งแหล่งวัตถุดิบที่กำลังเป็นที่น่าสนใจ นอกเหนือไปจากวัสดุประเภทแป้งหรือน้ำตาล อย่างไรก็ตามโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสนั้นมีลิกนินซึ่งเปรียบเสมือนผนังป้องกันไม่ให้เอนไซม์เข้าไปย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส กระบวนการปรับสภาพจึงมีความจำเป็นเพื่อกำจัดลิกนิน และปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส การปรับสภาพแต่ละวิธีจะมีผลกับเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ต่างกัน ดังนั้นวิธีการปรับสภาพ และสภาวะที่ใช้ควรจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับการไฮโดรไลซิส และขั้นตอนการหมักที่จะใช้ ในบทความนี้นำเสนอกระบวนการที่ใช้ในการปรับสภาพ เพื่อนำไปสู่การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส และคุณสมบัติที่สำคัญหลายอย่างที่สามารถนำไปใช้ในการลดต้นทุนในการผลิต และกระบวนการปรับสภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

Abstract

The ethanol production from lignocellulosic agricultural waste which contains cellulose and hemicellulose as the main component were another interesting alternative of raw materials beside starchy or sugar materials. However, the presence of lignin in lignocelluloses acts as the barrier to obstruct the enzyme accessibility to cellulose and hemicelluloses. Pretreatment process is necessary to remove lignin and alter cellulose structure to improve enzymatic hydrolysis. Each pretreatment has a different effect on the cellulose, hemicellulose and lignin fraction. Thus, different pretreatment methods and conditions should be chosen according to the process configuration selected for the subsequent hydrolysis and fermentation steps. This paper reviews the most interesting technologies for ethanol production from lignocellulose and it points out several key properties that should be targeted for low-cost and advanced pretreatment processes.

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของหน่วยวิจัยจุลทรีย์เพื่อการเกษตร คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** อาจารย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 โทร.034-281-105-7 ต่อ 7678 โทรสาร 034-351-402 E-mail: faasrpp@ku.ac.th

บทนำ

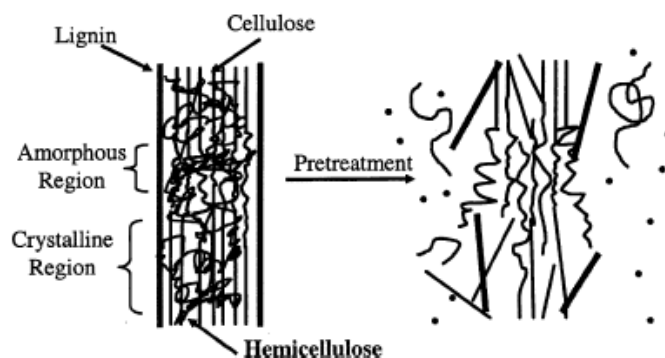
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) เป็นวัสดุที่มีอยู่ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของผนังเซลล์ (Lee et al., 2008) โดยทั่วไปจะเป็นวัสดุที่เหลือตกค้างอยู่ในไร่ นา หลังเก็บเกี่ยว ส่วนของใบ ลำต้น และราก เป็นจำนวนมากที่ต้องหาทางกำจัดทำลายทิ้ง เกษตรกรมักใช้วิธีการเผาเพื่อทำลายซึ่งล้วนแต่เป็นการสร้างมลภาวะแก่สิ่งแวดล้อมทั้งทางน้ำ และทางอากาศทั้งสิ้น นับเป็นการสูญเสียเปล่าที่นำเสียดายเป็นอย่างยิ่งจึงได้มีการคิดค้นหาหนทางนำส่วนเหลือใช้ที่ต้องกำจัดทิ้งเหล่านี้มาทำให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าหลายๆ แนวทาง และหนึ่งนั้นก็คือการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปแบบเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายวัสดุได้มากขึ้นในขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น และขั้นตอนการหมักเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล การใช้วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ผลิตเอทานอลมีข้อดี คือ มีปริมาณมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และเป็นวัสดุที่นำกลับมาใช้ใหม่ (renewable material) (รัชพล, 2554; Cheung and Anderson, 1997)

ในบทความนี้เป็นการนำเสนอภาพรวมของกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล สำหรับเป็นแนวทางสำหรับการประยุกต์ใช้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นประเภทลิกโนเซลลูโลส อีกทั้งยังเป็นการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ ซึ่งจะส่งผลดีต่อการกำจัดวัสดุเหล่านี้ออกจากสิ่งแวดล้อมทำให้สภาพแวดล้อมไม่เป็นพิษอันเนื่องมาจากการเสื่อมสลายของวัสดุเหล่านี้อีกด้วย

องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (รูปที่ 1) ในอัตราส่วนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ตารางที่ 1) โดยทั่วไปพบเซลลูโลสร้อยละ 40-60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-30 และลิกนินร้อยละ 15-30 (Lee et al., 2008)



รูปที่ 1 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส
ที่มา : Lee et al. (2008)

1. เซลลูโลส (Cellulose)

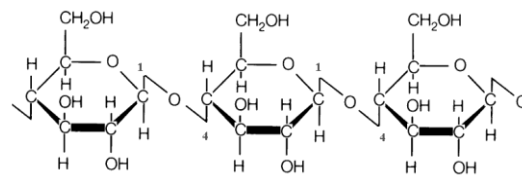
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืช อยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณร้อยละ 40-50 และเส้นใยฝ้ายพบประมาณร้อยละ 98 (Eriksson et al., 1990; Goshadrou et al., 2011)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ร้อยละของเซลลูโลส	ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส	ร้อยละของลิกนิน
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าคอสทอล เบอมิดา	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช	45	31.4	12.0

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Reshamwala et al.,1995; Cheung and Anderson, 1997; Boopathy, 1998; Dewes and Hunsche, 1998.

เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ เบต้า-D-กลูโคไพราโนส (β -D-Glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) เกิดเป็นโพลิเมอร์กลูแคน (glucan) มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous cellulose โดยส่วนของ crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า amorphous cellulose (เวสาร์ช และคณะ, 2556; Eriksson et al., 1990) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส แสดงในรูปที่ 2

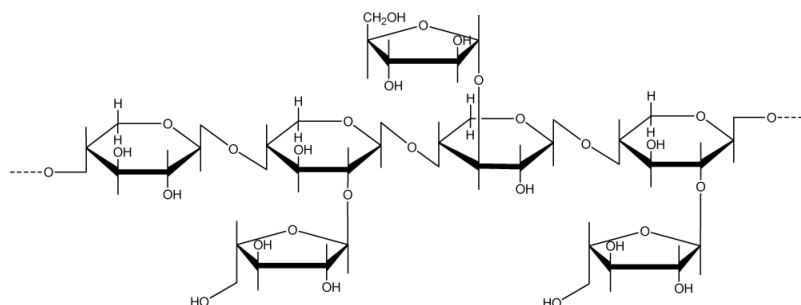


รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก

ที่มา : วนิดา และคณะ, 2550

2. เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ หลายชนิดผสมกัน เช่น กลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส ซึ่งพบอยู่ในรูปโพลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลกแตน และอะราบิแนน (Bastawde et al., 1992) มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 200 หน่วย โดยในพอลิเมอร์ไซแลน ดี-ไซโลสมีปริมาณมากที่สุดคือ ร้อยละ 85-93 ส่วนองค์ประกอบอื่น เช่น กลูโคส กรดกลูควิโรนิก กรดกาแลคตโรนิก จะพบปริมาณน้อย (Browning, 1963) โดยไซโลสที่พบจะเชื่อมด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก (Browning, 1963; Bastawde et al., 1992; Altintas et al., 2002) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของไซแลน แสดงในรูปที่ 3

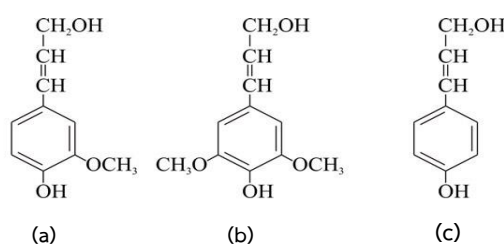


รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของไซแลน

ที่มา : Bastawde et al., 1992

3. ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์ของพืช พบในปริมาณที่แตกต่างไปตามชนิดของพืช ในธรรมชาติลิกนินเป็นส่วนป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่ตกผลึก (Cheng et al., 2008) ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด ประกอบด้วย *trans-p-coumaryl alcohol*, *trans-coniferyl alcohol* และ *trans-p-sinapyl alcohol* (Eriksson et al., 1990) นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นอีกมากมาย เช่น *vanillin* และ *syringaldehyde* (Yudkin and Offord, 1993) สูตรโครงสร้างของ *trans-p-coumaryl alcohol*, *trans-coniferyl alcohol* และ *trans-p-sinapyl alcohol* แสดงดังรูปที่ 4

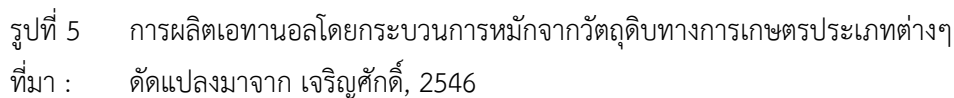


รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ (a) *trans-coniferyl alcohol* (b) *trans-p-sinapyl alcohol* และ (c) *trans-p-coumaryl alcohol*

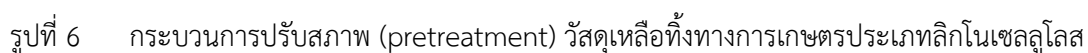
ที่มา : Eriksson et al., 1990

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอล

วัตถุดิบจัดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิตเอทานอล โดยมีค่าประมาณร้อยละ 60-70 ของต้นทุนการผลิตของโรงงาน (เจริญศักดิ์, 2546) ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจึงสมควรให้ความสำคัญต่อวัตถุดิบ วัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับนำมาผลิตเป็นเอทานอลมีดังนี้ พืชที่มีน้ำตาล เช่น อ้อย และหัวบีท พืชที่มีแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าว มันสำปะหลัง ผลพลอยได้จากกระบวนการต่างๆ เช่น หางนม วัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไม้ ส่วนที่เหลือของพืช รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด เป็นต้น (รูปที่ 5) ในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้น ต้องนำมาผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อให้ได้น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ไซโลส แมนโนส อะราบิโนส กาแลกโตส ก่อนจากนั้นจึงหมักด้วยยีสต์หมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล



ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางด้านกายภาพคือ ทำให้ชั้นแมทริกซ์ของวัสดุลิโธเซลลูโลสถูกทำลายซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานอย่างมีประสิทธิภาพส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น ในการศึกษาจะแสดงให้เห็นถึงกระบวนการปรับสภาพมีความสำคัญจะเป็นตัววัดความสำเร็จของเทคโนโลยีในการแปลงเซลลูโลส เนื่องจากเป็นตัวช่วยแสดงให้เห็นถึงความคุ้มค่าทางพาณิชย์ในการเปลี่ยนเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ เป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนความวัสตุ ซึ่งกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบแสดงดังรูปที่ 6 สามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลักๆ ซึ่งแต่ละวิธีมีวิธีย่อยลงไปอีกดังนี้



- วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การ
 เขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการ

เกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น ซึ่งปกติขนาดของเศษวัตถุดิบจะทำให้มีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun and Cheng, 2002)

1.2 การไพโรไลซิส (Pyrolysis)

วิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ให้วัตถุดิบกลายเป็นแก๊สหรือของแข็ง กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ จากการวิจัยพบว่าการใช้อุณหภูมิมากไปหรือน้อยไปจะไม่เป็นผลดี จึงต้องมีการวิจัยที่เหมาะสม ซึ่งสำหรับงานวิจัยนี้ยังมีข้อมูลที่ค่อนข้างน้อย

1.3 การใช้ความร้อน (Thermal heat treatment)

เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์ulos ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิมากกว่า 150-180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน

2. วิธีการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

จุลินทรีย์สามารถใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสและยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ ในการใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพ มักยังย่อยลิกนิน รวมทั้งย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยส่วนเซลลูโลสถูกย่อยน้อยมากซึ่งเซลลูโลสมีความต้านทานในการถูกจุลินทรีย์ย่อยของจุลินทรีย์ได้มากกว่าส่วนอื่นๆของลิกโนเซลลูโลส มีการใช้จุลินทรีย์ Brown-, White-, และ soft-rot fungi ในการปรับสภาพวัตถุดิบ White-rot fungi อาทิเช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* และ *Pleurotus ostreatus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการปรับสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Kumar et al., 2011; Sreenath et al., 2001; Slininger et al., 1982)

3. วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

3.1 การทำปฏิกิริยากับโอโซน (Ozonolysis)

โอโซนเป็นตัวออกซิแดนต์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุพวกฟางข้าวได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเอาลิกนินออกได้ดี ไม่มีสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียของวิธีนี้คือค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (Sun and Cheng, 2002)

3.2 การทำปฏิกิริยาดำด้วยการใช้ด่าง (Alkali pretreatment)

การใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุนั้นด้วย (McMillan, 1994) กลไกการทำงานของด่างนั้นเชื่อว่าจะไปเพิ่มการพองตัวของโมเลกุลภายในต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อกันใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและ คาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน อย่างไรก็ตามการใช้ด่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่มียกเว้นต่อวัสดุพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง ด่างที่นิยมใช้ในการ

แยกกลินินได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ Kim et al. (2008) ได้ศึกษาการปรับสภาพข้าวบาร์เลย์ด้วยแอมโมเนียพบว่าแอมโมเนียที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 24-72 ชั่วโมง สามารถสกัดแยกเอาส่วนของกลินินออกร้อยละ 50-66

3.3 การทำปฏิกิริยากับการใช้กรด (Acid pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพโดยใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภทได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือ ฟอสฟอริก ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซิส (Palmqvist and Hahn-Hagerdal., 2002) ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ การใช้กรดเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสะดวกศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด (Mussatto et al., 2005) การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัสดุที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟอริกมักจะถูกใช้สำหรับการเปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเอมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส (Silverstein et al., 2007) ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบที่ใช้ คือ (1) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (ร้อยละ 5-10 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิสูง ($T > 433$ องศาเซลวิน) และ (2) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (ร้อยละ 10-40 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิต่ำ ($T < 433$ องศาเซลวิน)

โดยทั่วไปแล้วพบว่าเมื่อทำการปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงและเวลาที่ใช้น้อยกว่าจะมีผลทำให้พบปริมาณไซโลสสูง และการทำงานของเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีกว่า ที่อุณหภูมิสูงการใช้กรดเจือจางพบว่ามีผลต่อการเพิ่มการย่อยเซลลูโลส ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและความเข้มข้นที่ใช้ โดยส่วนใหญ่ร้อยละ 80 และ 95 ของน้ำตาลในเอมิเซลลูโลสสามารถได้คืนมาโดยใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพจากการใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนั้นความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสารที่เป็นพิษ อุณหภูมิที่เหมาะสม (< 160 องศาเซลเซียส) ได้มีการพิสูจน์ว่าเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอมิเซลลูโลส ในอีกด้านหนึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อเซลลูโลสมากกว่าซึ่งพบว่าจะมีการเกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงและมีการสลายส่วนประกอบของลิกนิน (McMillan et al., 1994) การทำงานของกรดเจือจางในการแปลงสภาพจะมีผลไปยังกระบวนการไฮโดรไลซิสขององค์ประกอบของเอมิเซลลูโลสที่สามารถผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การมีอยู่ของเซลลูโลส เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โดยที่มีการกำจัดเอมิเซลลูโลสและส่วนที่เป็นลิกนิน โดยทั่วไปแล้วการใช้กรดเจือจางผสมกับวัสดุชีวมวลและทำที่อุณหภูมิสูงที่ 160-220 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาสั้นๆไปไฮโดรไลซ์เอมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลสและน้ำตาลตัวอื่นและจากนั้นจะมีการทำลายไซโลสให้เป็นเฟอฟูรัล กระบวนการไฮโดรไลซิสโดยไม่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนพบว่าผลผลิตที่ได้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 20 ในขณะที่เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพแล้วได้ผลผลิตมากกว่าร้อยละ 90 (Hamelinck et al., 2005)

4. การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมี (Physicochemical pretreatment)

4.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (McMillan, 1994) การระเบิดด้วยไอน้ำโดยส่วนใหญ่แล้วจะทำที่อุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.82 เมกะปาสคาล วัตถุดิบจะถูกผสมกับไอน้ำอิมพัลส์ที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดัน

อย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกิดการแยกเอาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำปฏิกิริยาที่มีผลในกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ เวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัสดุตั้งต้นที่ใช้และ ปริมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ (Duff and Murray, 1996) จากการศึกษาพบว่าค่าที่ดีที่สุดในการละลายเฮมิเซลลูโลสและการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส สามารถเกิดได้ภายใต้เงื่อนไขสภาวะอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้คือสภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง และมีการใช้เวลาที่ต่ำ (270 องศาเซลเซียส, 1 นาที) และที่สภาวะการใช้อุณหภูมิต่ำและเวลาที่ใช้มีค่าสูง (190 องศาเซลเซียส, 10 นาที) จากการศึกษาของ Wright (1998) พบว่าทั้งการใช้อุณหภูมิต่ำและ เวลาที่ใช้มากกว่าพบว่าผลที่ได้มีค่าสูงการเติมกรดเช่นพวก กรดซัลฟิวริก หรือการเติม ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำพบว่ามีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการไฮโดรไลซิส และเป็นการลดสารที่จะเป็นตัวต่อต้านในการเกิดปฏิกิริยาอื่นที่สำคัญและยังเป็นการทำให้มีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้อดีของวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ มีการสูญเสียพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ด้วยวิธีทางกล การแปลงสภาพโดยวิธีทางกลจะใช้พลังงานสูงกว่าร้อยละ 70 เป็นที่ทราบกันดีว่าวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำนั้นจะมีผลโดยตรงกับวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้อแข็ง และวัตถุดิบพวกของเหลือใช้ทางการเกษตร แต่จะมีผลน้อยมากต่อวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้ออ่อน (Clark and Mackie, 1987) วัสดุที่ผ่านกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการไฮโดรไลซิส แต่ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ก็คือในการทำลายแยกส่วนประกอบออกจากกันในส่วนของลิกนินมักเกิดไม่สมบูรณ์ และมักเกิดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่ไปตัวยับยั้งการเกิดจุลินทรีย์ เพราะว่าองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยออกมาจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (enzymatic hydrolysis) รวมถึงการหมักด้วย เนื่องจากองค์ประกอบที่ได้จากการย่อยออกมาเป็นสารที่เป็นตัวต่อต้าน และเป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์ กระบวนการไฮโดรไลซิส และกระบวนการหมักทำให้ต้องมีการล้างด้วยน้ำเพื่อทำให้สารที่เป็นพิษเหล่านี้ออกไป การล้างมีผลทำให้น้ำตาลที่ได้ถูกชะล้างหรือสูญเสียไปด้วย

4.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion, AFEX)

วิธีการนี้ใช้แอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันระยะเวลาหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลงซึ่งมีผลต่อวัตถุดิบโดยวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะมีอัตราการเป็นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ไม่เหมาะสมกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก ในกระบวนการนี้สามารถนำแอมโมเนียกลับมาใช้ได้ใหม่ และไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีอื่น อาทิเช่น การระเบิดด้วยไอน้ำจะได้ลักษณะของตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (slurry) สามารถทำการแยกเป็นส่วนเป็นส่วนของแข็งและของเหลวออกจากกันได้ ในขณะที่ AFEX จะให้ตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพเป็นของแข็งเท่านั้น (Alvira et al., 2010)

4.3 ความร้อนชื้น (Liquid hot water)

วิธีการนี้เป็นอีกกระบวนการที่มีการใช้ความร้อนชื้น ซึ่งจะดำเนินการอย่างช้าๆ และไม่ต้องการสารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ต้องอาศัยความดันเพื่อควบคุมสถานะของน้ำในสภาวะของเหลวอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 160-240 องศาเซลเซียส โดยจะส่งผลต่อเฮมิเซลลูโลส ตัวอย่างได้หลังจากการปรับสภาพจะอยู่ในรูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (slurry) โดยส่วนที่เป็นของแข็งส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลส ส่วนของเหลวส่วนใหญ่เป็นเฮมิเซลลูโลส และเกิดน้ำตาลบางส่วน ทั้งนี้ควรมีการปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4-7 เนื่องจากว่าในช่วงดังกล่าวทำให้

เฮมิเซลลูโลสยังคงอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ (oligomeric form) ช่วยลดปัญหาการเกิดรวมตัวเกิดเป็นโพลีเมอร์ใหม่อีกครั้ง (Mosier et al., 2005)

4.4 การย่อยเปียก (Wet oxidation)

วิธีการนี้ใช้ออกซิเจน และอากาศเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา นิยมใช้ถังหมักชีวภาพในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำภายใต้แรงดัน และเวลาสั้น โดยทั่วไปจะใช้เวลา 10-15 นาที อุณหภูมิ 170-200 องศาเซลเซียส และความดันระหว่าง 10-12 บาร์ ของออกซิเจน (Ogbonna et al., 2001) จากงานวิจัยของ Mishima et al. (2006) พบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ทำให้ปริมาณเซลลูโลสมีค่าเพิ่มขึ้น นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในขบวนการหมักแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

4.5 การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave pretreatment)

วิธีการปรับสภาพโดยอาศัยคลื่นไมโครเวฟจัดเป็นวิธีการทางกายภาพร่วมกับทางเคมี เนื่องจากมีการใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ และส่วนที่ใช้สารเคมีเจือจางในการแช่วัสดุ การให้คลื่นไมโครเวฟจะแตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุใช้เวลาประมาณ 5-20 นาที (Keshwani, 2009) จากการศึกษาเบื้องต้นของ เวสาร์ช และรัชพล (2555) และ Zhu et al. (2006) พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟมากกว่าสารละลายกรด

4.6 การปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์ (Ultrasonic pretreatment)

วิธีการปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์ยังมีรายงานเกี่ยวกับวิธีดังกล่าวนี้ แต่ผลที่ได้จากการใช้คลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์พบว่าส่งผลให้เกิดการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น จากงานวิจัยของ Yachmenev et al. (2009) พบว่าคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์มีผลทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับพื้นที่ผิวของวัสดุได้มากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

4.7 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ explosion)

วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากกรดคาร์บอนิกในการเพิ่มปฏิกิริยาย่อยสลายขั้นต่อไป นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมด้วย อาทิเช่น เอทานอล ช่วยในการกำจัดสารประเภทลิกนิน แต่วิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนไฮโดรไลซิสเหมือนวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (Ragg and Fields, 1987)

สรุป

กระบวนการปรับสภาพสำหรับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสถือว่าเป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่สำคัญต่อการใช้ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึง และย่อยวัสดุได้มากขึ้น โดยเฉพาะในขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าจุดเด่น และจุดด้อยของเทคนิคการปรับสภาพซึ่งแต่ละเทคนิคส่งผลให้กระบวนการผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งนี้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส และการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลอยู่มากซึ่งใช้กระบวนการปรับสภาพที่แตกต่างกันโดยแต่ละกระบวนการจะส่งผลต่อ

องค์ประกอบของวัสดุเหล่านี้แตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 3) ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจำเป็นต้องทำการศึกษา และคัดเลือกกระบวนการการปรับปรุงสภาพที่เหมาะสม จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตอย่างมาก อีกทั้งยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ ซึ่งส่งผลดีต่อการกำจัดวัสดุเหล่านี้ออกจากสิ่งแวดล้อมทำให้สภาพแวดล้อมไม่เป็นพิษอันเนื่องมาจากการเสื่อมสลายของวัสดุเหล่านี้

ตารางที่ 2 จุดเด่นและจุดด้อยของกระบวนการปรับปรุงสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสที่แตกต่างกัน

การปรับปรุงสภาพ	จุดเด่น	จุดด้อย
ทางชีวภาพ	- ย่อยสลายลิกลิน และเฮมิเซลลูโลส - ใช้พลังงานต่ำ	- มีอัตราการย่อยสลายช้า
การบด การโม่	- ลดขนาดของเซลลูโลส	- ใช้พลังงานและพลังงานสูง
การระเบิดด้วยไอน้ำ	- มีผลทำให้ลิกลินเปลี่ยนรูป และย่อยสลาย เฮมิเซลลูโลสได้ดี - คุ่มค่าการลงทุน - ให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส และเฮมิเซลลูโลสสูง	- มีองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษเจือปน
AFEX	- ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย - เกิดตัวยับยั้งในขั้นตอนการย่อยน้อย	- ไม่เหมาะสมกับวัสดุที่มีปริมาณลิกลินสูง - การลงทุนสูง
การระเบิดด้วย CO ₂	- ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย - คุ่มค่าการลงทุน - มีองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษเจือปนน้อย	- ไม่มีผลต่อลิกลิน และเฮมิเซลลูโลส - ระบบต้องใช้แรงดันสูง
การย่อยเปียก	- มีประสิทธิภาพในการแยกลิกลิน - มีองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษเจือปนน้อย - ใช้พลังงานต่ำ	- มีค่าใช้จ่ายสูงในส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยา
ปฏิกิริยาโอโซน	- ลดปริมาณลิกลิน - ไม่ก่อให้เกิดองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษ	- มีค่าใช้จ่ายสูง
สารละลายอินทรีย์	- ส่งผลต่อการย่อยสลายลิกลิน และเฮมิเซลลูโลส	- การลงทุนสูง - การใช้สารละลายอินทรีย์ต้องมีดูแลและจัดการที่ดี

ตารางที่ 2 จุดเด่นและจุดด้อยของกระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสที่แตกต่างกัน (ต่อ)

การปรับสภาพ	จุดเด่น	จุดด้อย
กรดความเข้มข้นสูง	- ให้ผลผลิตกลูโคสสูง - เกิดปฏิกิริยาในสภาวะปกติ	- ค่าใช้จ่ายสูง และการจัดการต้องอยู่ภายใต้การควบคุม - เกิดสารพิษเจือปนสูง
กรดเจือจาง	- ลดปัญหาการกัดกร่อนเมื่อเปรียบเทียบกับกรดความเข้มข้นสูง - เกิดองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษต่ำ	- ผลผลิตค่อนข้างหลากหลาย - ให้ผลผลิตน้ำตาลต่ำ

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Alvira et al. (2010)

ตารางที่ 3 ผลกระทบของกระบวนการปรับสภาพต่อองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

	การบด	การ ระเบิด ด้วยไอน้ำ	ความ ร้อนขึ้น	กรด	ด่าง	สารออก ซิแดนส์	AFEX	การ ระเบิด ด้วย CO ₂
- เพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา	สูง	สูง	สูง	สูง	สูง	สูง	สูง	สูง
- การย่อยสลายผลึกเซลลูโลส	สูง	-	n.d.	-	-	n.d.	สูง	-
- การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส	-	สูง	สูง	สูง	ต่ำ	-	ปานกลาง	สูง
- การแยกลิกนิน	-	ปานกลาง	ต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง	สูง	-
- เกิดองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษเจือปน	-	สูง	ต่ำ	สูง	ต่ำ	ต่ำ	ต่ำ	-
- เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนิน	-	สูง	ปานกลาง	สูง	สูง	สูง	สูง	-

n.d. ไม่ปรากฏข้อมูล

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Alvira et al. (2010)

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- เจริญศักดิ์ โจรนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2546. การศึกษาต้นแบบโรงงานเอทานอลโดยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตจากมันเส้น. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ
- รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2554. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลสเฟกต์บดขยาโดยหมอนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal, SU Vol.4 No.1: 891-901
- วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์. 2553. การผลิตเอทานอลจากไม้มูลาติปัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาล และหมักพร้อมกัน. น 392-400. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ.
- เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2555. การปรับสภาพผักตบขยา (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) และ จอก (*Pistia stratiotes* L.) ด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับด่าง และกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิฟ. Sakon nakon graduate studies Journal, Vol.10 No. 45: 173-184.
- เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การใช้ประโยชน์วัสดุพุงจากขยะธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์ และประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal, SU Vol.6 No. 1:795-807.

ภาษาต่างประเทศ

- Altintas, M.M., U lgen K.O., Kirdar, B. O., nsan, Z.I. and Oliver, S.G. 2002. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. Enzyme Microb Technol 31, pp. 640-647.
- Alvira., P.E. Tomas-Pejo., M. Ballesteros. and M.J. Nergro. 2010. Pretreatment technology for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101, 4851-4861.
- Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. World J. of Microbiol. and Biotechnol. 8 : 355-368.
- Browing, B.L. 1963. Method in wood chemistry, pp.389-407. Interscience Publishers, New York, London.
- Boopathy, R., 1998. Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors. Bioresour. Technol. 64, 1-6.
- Cheng, K.K., J.A. Zhang., W.X. Ping., J.P. Ge., Y.J. Zhou., H.Z. Ling and J.M. Xu. 2008. Sugarcane Bagasse Mild Alkaline/Oxidative Pretreatment for Ethanol Production by Alkaline Recycle Process. Biochem Biotechnol. 151:43-50.
- Cheung, S.W., and Anderson, B.C., 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. Bioresour. Technol. 59, 81-96.

- Clark, T.A., and Mackie, K.L., 1987. Steam explosion of the soft-wood .Pinus radiata with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. J. Wood Chem. Technol. 7, 373–403.
- Duff, S. J. B. & Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology, 55, 1-33.
- Eriksson, K.E.L. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Science and Technology 24 : 79-101
- Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette. And P. Ander. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component. Springer Verlag, Berlin. 407 p.
- Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2011. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. Ind Crops Prod 34:1219–1225.
- Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short, middle, and long term. Biomass and Bioenergy 28(4):384-410.
- Keshwani, D.R. 2009. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Thesis Dissertation. North Carolina State University.
- Kim, T.H., F. Taylor and K.B. Hicks. 2008. Bioethanol Production from Barley Hull Using SSA (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment. Bioresource Technology. 99:5694-5702.
- Kumar S, Singh, S.P., Mishra, I.M. and Adhikari, D.K. 2011. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor, Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels, 2(1), 1-6.
- Lee, J.S., B. Parameswaran., J.P. Lee and S.C. Park. (2008). Recent Developments of Key Technologies on Cellulosic Ethanol Production. Journal of Scientific & Industrial Research. 67:865-873.
- McMillan, J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In:Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324
- Mishima, D., M. Tateda., M. Ike and M. Fujita. 2006. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. Bioresour. Technol. 97(16): 2166-2172.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 96: 673-686.

- Mussatto, S.I., G. Dragone and I.C. Roberto. 2005. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. Process Biochem. 40: 3801–3806.
- Ogbonna, J. C., H. Mashima and H. Tanaka. 2001. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. Bioresources Technology. 76:1-8.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates.I: Inhibition and Detoxification. Bioresource Tech V. 74: 17-24.
- Ragg, P. L. and Fields, P. R., 1987. The development of a process for the hydrolysis of lignocellulosic waste. Phil Trans R Soc Lond A321, 537-547
- Reshamwala S, Shawky BT, Dale BE. 1995. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switch grass. Appl Biochem Biotechnol, 51/52: 43-55.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pre-treatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresource Technology, 98, 3000-3011
- Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. van Cauwenberge and C.P. Kurtzman. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Bioeng. 24:371-384.
- Sreenath, H.K., R.G. Koegel., A.B. Moldes., T.W. Jeffrie and R.J. Straub. 2001. Ethanol Production from Alfalfa Fiber Fraction by Saccharification and Fermentation. Proc. Biochem. 36:1199-1204.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for bioethanol production: review. Bioresour. Technol. 83, 1-11.
- Wright JD. 1998. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. Chem Eng Prog; 84: 62–74
- Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T. and Lambert, A. 2009. Acceleration of enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse by low intensity uniform ultrasound. J. Biobased Mater. Bioenergy. 3, 25-31.
- Yudkin, M. and Offord, R. 1973. Comprehensive biochemistry. American ed, Biochemistry Bibliography: p. 547-550.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R., Liao, J. and Zhang, Y. 2006. Comparison of three microwave / chemical pretreatment process for enzymatic hydrolysis of rice straw. Biosyst. Eng. 93, 279-283.